

【総説】

パターン認識受容体 RAGE の生理的役割と病態への関与

Biochemical, physiological and pathogenetic roles of RAGE, a pattern recognition receptor

金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生物学
(生化学第二)

山 本 靖 彦

はじめに

RAGE (receptor for advanced glycation end-products) は当初、タンパク質翻訳後修飾、老化など様々な生命現象に関わる非酵素的糖化反応(グリケーション)によって生じた最終糖化反応生成物(advanced glycation end-products, AGE)の細胞表面受容体として同定された。RAGEは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型の1型膜タンパクで、現在ではAGEのみならず、がん転移および炎症に関わる high mobility group B1 (HMGB1)をはじめとする様々なリガンドを認識し、多彩な生物学的機能を有するパターン認識受容体(pattern recognition receptors, PRRs)の一員であると理解されている。具体的な生理活性リガンドとしてAGEやHMGB1以外に、酸化ストレスから生じる advanced oxidation protein products (AOPP)、アルツハイマー病に関連するアミロイド β 、免疫系細胞から分泌される炎症メディエーター S100タンパク[S100A7, S100A8 (calgranulin A), S100A9 (calgranulin B), S100A12 (calgranulin C), S100b など]、白血球の細胞表面にある Mac1/CD11b、細菌の膜構成成分リポポリサッカライド(lipopolysaccharide, LPS)、補体C3a、heat shock proteins (HSPs)、アポトーシス細胞上のフォスファチジルセリン、生理活性リゾリン脂質のうちのリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid, LPA)などが現在知られている^{1)~4)}。

当研究室ではこれまでにRAGEの機能的役割を明らかにするため、RAGE過剰発現マウス、RAGE欠損マウスなどを作製し、解析に用いてきた^{5),6)}。同時にRAGEには分子多様性がある、RAGE遺伝子転写産物から選択的スプライシングの違いによって細胞内シグナル伝達を行う従来の膜型RAGE以外にも新たに内在性分泌型RAGE(endogenous secretory RAGE, esRAGE)が生じること、膜型RAGEもタンパク分解酵素により細胞膜直上で切断sheddingされ可溶性RAGE(soluble RAGE, sRAGE)に転換しうることを報告してきた(図1)^{1),7)}。本項では、特に最近のパターン認識受容体の意義とRAGEの生理的役割、さらには様々な病態への関与について紹介したい。

パターン認識受容体 (PRRs)

免疫は生体内に存在する異物を感知してそれを排除するシステムであるが、その中で自然免疫系は外来の微生物に対する先天的に備わった非特異的な応答として理解されてきている。異物としての認識は微生物などに固有の分子パターンを標的に行われ、獲得免疫と比較して特異性では劣り免疫記憶も存在しないが、病原体の侵入に対して即時に対応可能で、自己にない分子パターンを直接認識する方法はシンプルであるが破綻しにくいと考えられている。そのような分子パターンを認識する受容体がパターン認識受容体 (PRRs) である。PRRsは大きく分けて①分泌タイプ、②エンドサイトーシスタイプ、③シグナル伝達タイプの計3種類があると言われている。分泌タイプにはマンノース型レクチンや補体C3bなどがあり微生物や死細胞の排除を行う補体系の活性化を誘導する。エンドサイトーシスタイプには単球/マクロファージ系細胞の表面に存在するマクロファージマンノース受容体やスカベンジャー受容体などがあり、細胞貪食に関わる。シグナル伝達タイプにはToll様受容体 (Toll-like receptors, TLRs)、RIG-1様受容体 (RIG-1-like receptors, RLRs)、NOD様受容体 (NOD-like receptors, NLRs)、AIM2様受容体 (AIM2-like receptors, ALRs)、C型レクチン受容体 (C-type lectin receptors, CLRs)、そしてRAGEがある。これらは外来微生物由来の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 以外にも組織傷害や炎症応答による danger シグナル damage-associated molecular patterns (DAMPs) を認識することで細胞内シグナル伝達を発生し、サイトカイン、ケモカインに代表される遺伝子発現誘導を引き起こす(図1)。

RAGE の機能的役割と疾患への関与

RAGEは2型糖尿病、糖尿病血管合併症、膵 β 細胞疲弊、動脈硬化、心筋虚血による心筋障害、高酸素による肺障害、肺線維症、骨粗鬆症、糖尿病における皮膚の血管新生障害、敗血症、脳虚血による神経細胞死、アルツハイマー病、がん転移、アポトーシス細胞の処理、アレルギー反応、大腸炎に代表される炎症性疾患にも機能的に関与することがマウスなどを使った実験により証明された^{1)~10)}。以下に代表的な例について概説する。

1. RAGE と肥満, 2 型糖尿病そして糖尿病血管合併症

肥満を伴うメタボリック症候群においては局所炎症反応に加えて全身の炎症反応も亢進している。RAGE ノックアウト ($RAGE^{-/-}$) マウスに高脂肪食負荷を行っても対照の野生型マウスは有意な体重増加を認めたのに対し、飼育観察期間を通して体重への影響は見られなかった⁸⁾。精巢上体脂肪重量の増加率も $RAGE^{-/-}$ マウスでは有意に低かった⁸⁾。つまり $RAGE^{-/-}$ マウスは肥満に抵抗性であった。成熟脂肪細胞への分化アッセイ系である 3T3-L1 培養細胞系においても RAGE 過剰発現によって脂肪細胞は肥大化し、逆に RAGE 発現を siRNA でノックダウンすると肥大化は有意に抑制された⁸⁾。白色脂肪組織における RAGE 発現と RAGE シグナルは肥満を惹起するものと考えられた。

糖尿病罹病期間が長期にわたり、さらに血糖コントロールが良くない状態が続くと、インスリンを産生・分泌する膵 β 細胞が慢性的な高血糖にさらされることになる。そのような状況下ではインスリン合成・分泌能が直接障害され、その結果、高血糖状態はさらに悪化するという膵 β 細胞糖毒性と呼ばれる悪循環に陥る。高血糖の持続は膵臓のインスリン分泌能を低下させるにとどまらず、インスリンの主な標的臓器である肝臓・筋肉・脂肪

組織のインスリン抵抗性をも増強する。このような糖毒性 (glucotoxicity) といわれる状態は糖尿病の合併症である血管障害の発症進展にも深く関わる。肥満 2 型糖尿病マウスである *ob/ob* あるいは *db/db* マウスから膵ランゲルハンス島を単離し、酵素処理によって単一細胞に分散化後、フローサイトメトリーで解析すると、膵 β 細胞で RAGE 発現を認めた⁹⁾。その対照群である非糖尿病野生型マウスの β 細胞においては RAGE 発現を確認できなかった⁹⁾。 $RAGE^{-/-}$ マウスを *db/db* マウスと掛け合わせることで、RAGE 欠損 *db/db* ($RAGE^{-/-} db/db$) マウス、RAGE 野生型 *db/db* ($RAGE^{+/+} db/db$) マウスを作製し調べると、耐糖能、インスリン分泌能は $RAGE^{-/-} db/db$ マウスにおいて良好で、アポトーシスに陥った膵 β 細胞数も少なく、膵 β 細胞容積・数も保たれ、膵 β 細胞疲弊から免れていた⁹⁾。マウス由来膵 β 細胞株 MIN6 細胞を用いた細胞培養実験では、遊離脂肪酸 (free fatty acids, FFA) である 0.2 mM パルミチン酸あるいはオレイン酸を 24 時間暴露すると RAGE が細胞膜上に発現誘導され、0.2 μ g/ml レプチン受容体アンタゴニストの前処理でさらにその発現が増強することが分かった⁹⁾。つまり、FFA などの脂肪毒性 lipotoxicity が RAGE 発現誘導のトリガーとして働き、レプチンシグナルの障害がその効果を

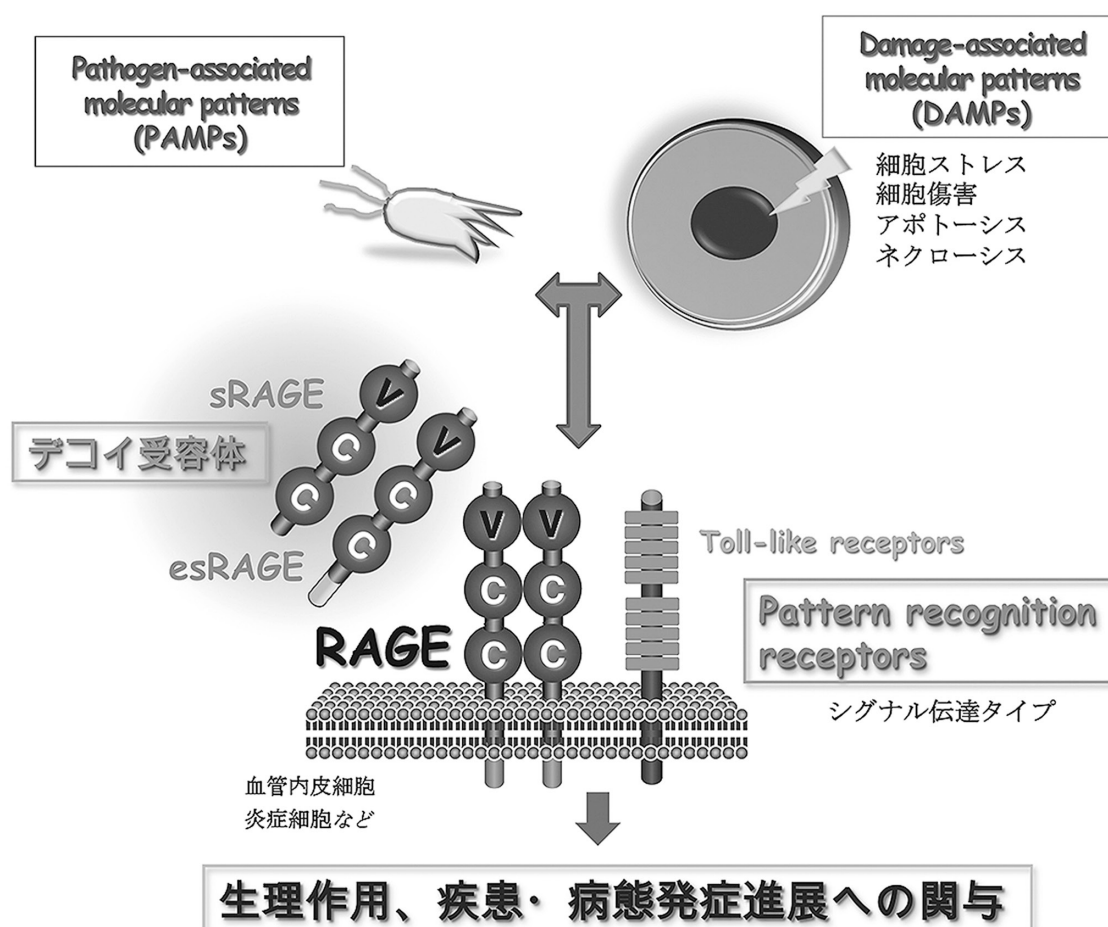


図 1. パターン認識受容体 (pattern recognition receptors) シグナル伝達タイプの RAGE. sRAGE, soluble RAGE; esRAGE, endogenous secretory RAGE.

増幅するものと考えられた。そのようなRAGE発現誘導の条件下で高血糖により生じる糖化反応産物AGEの暴露が加わることで、グルコース刺激によるインスリン分泌能は有意に低下し、アポトーシス細胞数は著増した⁹⁾。つまり、膵β細胞糖毒性は脂肪毒性lipotoxicityの関与と同時にレプチンシグナル抵抗性による作用増強によって引き起こされると推測された。2型糖尿病において糖毒性・脂肪毒性(糖脂肪毒性glucolipotoxicity)により膵β細胞は傷害を受け、それによってインスリン分泌が低下し、さらに持続する高血糖に陥ると考えられた(図2)。

また、血管内皮細胞でヒトRAGEを過剰発現するトランスジェニックマウスに1型糖尿病を発症させて観察すると糖尿病網膜症、腎症は増悪した⁹⁾。逆にRAGE^{-/-}マウスに1型糖尿病を誘発すると糖尿病網膜症、腎症の発症は遅れ、病態は軽減した^{9),10)}。つまり、RAGEは糖尿病血管合併症の発症進展に原因的に働いていることが考えられた(図2)。

2. LPS, HMGB1, RAGE と敗血症性ショック

敗血症性ショックは、救急救命治療の発達した先進国においても未だ高頻度に致死経過をたどる重篤な病態であり、その多くにグラム陰性菌感染が関与している。グラム陰性菌由来の病因物質であるLPSは、CD14/Mac-1/TLR4を介して単球/マクロファージを活性化し、TNF α 、IL-1 β 、一酸化窒素NOなどサイトカインメディ

エータの産生を誘導することによって敗血症性ショックの発症に深く関わる。また、LPS刺激によって好中球のアポトーシスが抑制され、その寿命が延び、活性化された好中球が組織障害さらに多臓器不全の進展に関わると考えられている。

これまでにLPSにより誘導される敗血症性ショックに対しRAGE^{-/-}マウスが野生型マウスに比べて低反応性である事実は観察していたが、そのメカニズムの詳細は不明であった。最近、RAGEはLPSを直接認識する新たなLPS受容体であることを見出した²⁾。マウスのLPS投与実験を行うと、血中のLPS濃度に差が無いにも関わらずRAGE^{-/-}マウスは野生型マウスに比べ生存率は著しく良かった²⁾。血中TNF α 、IL6、エンドセリン1(ET-1)、HMGB1レベルもRAGE^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて低値であった²⁾。RAGEリガンドの一つであるHMGB1は敗血症における晩期の炎症性サイトカインであり、予後悪化に関与する重要な因子と考えられ「死のメディエーター」とも呼ばれている。敗血症性ショックに深く関わっているといわれている肺と肝臓の組織障害レベルもRAGE^{-/-}マウスで軽度であった²⁾。続いて、RAGEによる敗血症性ショックに対する新たな治療法としてのRAGEのデコイ型受容体であるsRAGE投与実験を行った。LPSによって誘導されるNF κ Bの活性化、TNF α やHMGB1の産生は、sRAGE投与によって抑制され、敗血症性ショックを誘導した野生型マウスの生存率

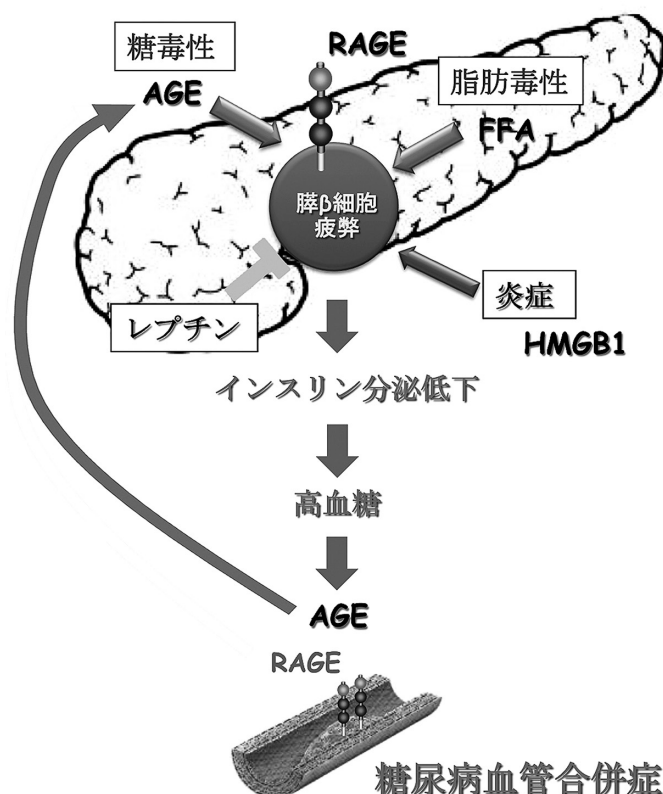


図2. 2型糖尿病における膵β細胞疲弊のモデル。AGE, advanced glycation end-products; FFA; free fatty acids, HMGB1, high mobility group b-1.

を有意に向上させた²⁾。加えてそれにとどまらず、 $RAGE^{-/-}$ マウスの生存率も上昇させる効果があることが判明した。つまり、sRAGEはデコイ受容体としてLPS及びHMGB1に結合することによってLPS-RAGE系とHMGB1-RAGE系を阻害するのみならず、TLR4系のシグナル伝達をもブロックすることによって炎症を抑制する可能性が考えられた(図3)。LPSによって誘導されたサイトカインの上昇や肺・肝臓の臓器障害程度もsRAGE投与によって有意に軽減していた。これらの結果より、sRAGE投与は敗血症性ショックに対する治療法として有用であると評価された(図3)。

3. RAGE と感染症

RAGEと様々な感染性に関する報告がなされている。Respiratory syncytial virus (RSV)によって引き起こされる体重減少や炎症レベルは、 $RAGE^{-/-}$ マウスでは野生型マウスに比べ軽く、生存率も向上していた。また、*Streptococcus pneumoniae*によって引き起こされる炎症は、sRAGEの投与によって有意に抑制されることが分かった。つまりRAGEはLPSなどによって引き起こされる敗血症性ショックにとどまらず、様々な感染症においても重要な働きをしている可能性がある。

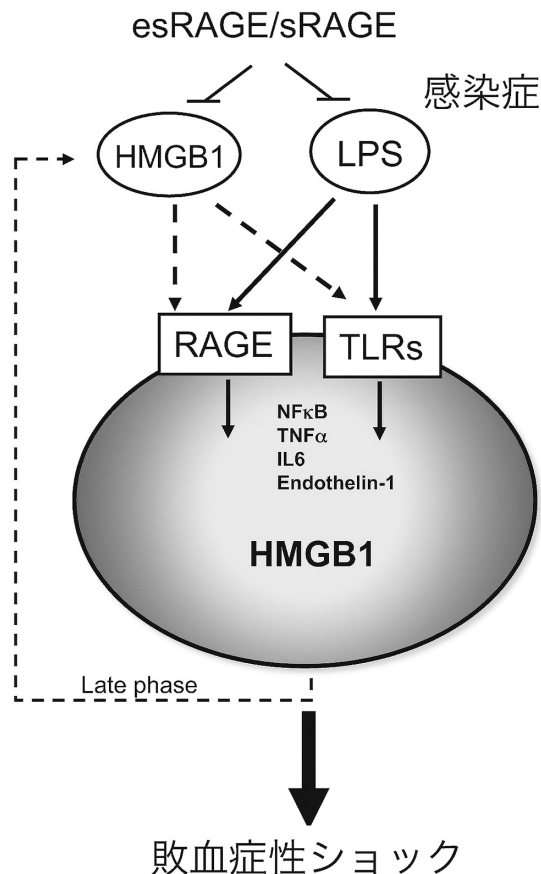


図3. リポポリサッカライド (LPS) により誘導される敗血症性ショックの病態。TLRs, toll-like receptors; HMGB1, high mobility group b-1.

4. RAGE とアポトーシス細胞

RAGEを介したアポトーシス細胞認識機能のメカニズムが明らかになった。つまり、アポトーシスに陥った死細胞の細胞膜上に発現するフォスファチジルセリンがRAGEと結合するというものである⁴⁾。RAGEを発現する貪食細胞によってアポトーシス細胞は処理されることになる。

5. RAGE とがん転移

RAGEは、悪性腫瘍においてはHMGB1をリガンドとして増殖・転移に関わる。これまでに、低分子ヘパリン (low molecular weight heparin, LMWH) がRAGEに対してはアンタゴニストとして働き、糖尿病血管合併症の予防治療効果があることを報告してきた⁶⁾。一方、臨床的にはLMWHの投与によって腫瘍の増殖・転移の抑制など、抗腫瘍効果があるという報告がなされていた。そこで、培養ヒト線維肉腫細胞 (HT1080) を用いてHMGB1-RAGE系を抑制することが抗腫瘍効果に繋がるかどうかを実験的に検討した。HMGB1の刺激によってRAGEの下流シグナルであるNFκB, Cdc42, Rac1がRAGE依存的に活性化され、HT1080細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を亢進させた¹¹⁾。LMWH処理を行うことでそのような腫瘍細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が有意に抑制された¹¹⁾。また、ヌードマウスを使ったHT1080細胞の局所腫瘍形成能、肺転移もLMWH投与によって有意に抑制可能であった¹¹⁾。つまり、以上のことから、HMGB1-RAGE系を抑制することは抗腫瘍効果に繋がり、がん治療に有効である可能性が考えられた。

RAGE とデコイ受容体

RAGEには実は細胞膜上に存在し細胞内シグナル伝達を行う受容体としての分子構造の他に、膜から切り離された可溶型あるいは分泌型の分子も存在する。一つのRAGE遺伝子から選択的スプライシングによって作り出されるこの分泌型RAGEを内在性分泌型RAGE(esRAGE)と命名した¹⁾。また、完全長膜型RAGEがmatrix metalloproteinase (MMP)9やa disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM)10などの酵素によって細胞膜直上で切断 (shedding) され、可溶型RAGE(sRAGE)となるものもある^{11, 7)}。このようなesRAGEやsRAGEは、リガンド結合部位を持つため、細胞外でリガンドを捕捉し細胞表面のRAGEを阻害するデコイ受容体として機能する(図1)。RAGE sheddingを増強することは、細胞内シグナル伝達を引き起こす完全長膜型RAGEの量を減少させると同時に、デコイ受容体として働くsRAGEの量を増加させるというダブルのRAGE抑制効果を生み出すことに繋がる。薬剤においては、アンジオテンシン変換酵素阻害薬などはesRAGEの分泌促進に働いている可能性が考えられ、チアゾリジン系薬剤、スタチン系薬剤、アンジオテンシンII受容体拮

抗薬などもsRAGEレベルを上昇させる作用があると報告されている¹⁾。

開発上市したヒトesRAGE ELISA測定系を使って、これまで血中esRAGE濃度が様々な疾患のリスク予知因子になりうるという研究報告が多数なされている。例えば、糖尿病の領域において、2型糖尿病症例でesRAGE濃度の低下は、糖尿病症例における動脈硬化、網膜症の感受性マーカーになる可能性があるということである²⁾。ただし、esRAGE濃度と病態との関係を解析する上でその解釈に細心の注意を払う必要がある。特に気を付けなくてはならない点は、血中esRAGE濃度は腎機能に強く影響を受けるということである。糖尿病腎症進展後あるいは腎機能障害があり血中クレアチニン値が上昇すると、それにともないesRAGE濃度は正の相関をもって上昇する³⁾。また、sRAGEにおいては最近、大規模コホート研究The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Studyに登録されていた15,792例のうちの1,201症例の解析が行われ、血漿sRAGE濃度が低いことが将来の糖尿病発症および心血管イベントの発症リスクであるという結果が示された⁴⁾。この結果は、sRAGEが糖尿病および心血管イベントの発症予測マーカーになりうることを示している。esRAGE同様、sRAGEに関する研究においても一時点での関連を調べた研究が多く、今後大規模前向きコホート研究において血中esRAGE濃度あるいは血中sRAGE濃度と各種疾患の関連を調べることが望ましいと考えられる。

お わ り に

以上のように、RAGEは様々な病態や疾患の発症進展に関わっていることが明らかになってきた。しかし、RAGEの細胞内シグナル経路の全貌、RAGE/esRAGEのスプライシングの制御機構、RAGEのshedding分子機構、esRAGE/sRAGEの代謝排泄機構など、未だ十分理解されていないことも多い。さらに重要なことは、自然免疫に関わるパターン認識受容体(PRRs)は一般的に下等動物も持ち合わせているが、RAGEは高等動物にしか存在しないという事実である。高等動物はなぜこのようなRAGEを持つことになったのか、本来の生理学的な役割は何であるのか、RAGEを持つことによって高等動物はどのような高等動物としての機能を担うことになったのか、興味は尽きず、今後も謎の解明に取り組んでいきたい。

謝 辞

本総説の執筆にあたり研究のご指導を賜りました金沢大学理事・副学長の山本博先生、学外学内の共同研究者の皆様、ならびに金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生物学(生化学第二)の教室員、関係の先生方に深謝致します。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長の井関尚一教授ならびに関係の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE-mediated inflammation and diabetic vascular complications. *J Diabetes Invest* 2(3): 155-157, 2011
- 2) Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ligation of LPS. *J Immunol* 186(5): 3248-3257, 2011
- 3) Sugihara T, Munesue S, Yamamoto Y, Sakurai S, Akhter N, Kitamura Y, Shiba K, Watanabe T, Yonekura H, Hayashi Y, Hamada J, Yamamoto H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products inhibits amyloid-beta1-42 uptake into mouse brain. *J Alzheimer's Dis* 28(3): 709-720, 2012
- 4) He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Yamaya M, Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE binds phosphatidylserine and mediates clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep* 12(4): 358-364, 2011
- 5) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108(2): 261-268, 2001
- 6) Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, Watanabe T, Shinohara H, Takeuchi M, Hashimoto N, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low molecular weight heparin. *Diabetes* 55(9): 2510-2522, 2006
- 7) Yamamoto Y, Miura J, Sakurai S, Watanabe T, Uchigata Y, Iwamoto Y, Koyama H, Yamamoto H. Assaying soluble forms of receptor for advanced glycation endproducts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 33-34, 2007
- 8) Monden M, Koyama H, Otsuka Y, Morioka T, Mori K, Shoji T, Mima Y, Motoyama K, Fukumoto S, Shioi A, Emoto M, Yamamoto Y, Yamamoto H, Nishizawa Y, Kurajoh M, Yamamoto T, Inaba M. Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of toll-like receptor 2. *Diabetes* 62(2): 478-489, 2013
- 9) Han D, Yamamoto Y, Munesue S, Motoyoshi S, Saito H, Myat TTW, Watanabe T, Tsuneyama K, Yamamoto H. Induction of RAGE by insufficient leptin action triggers pancreatic beta-cell failure in type 2 diabetes. *Genes Cells* 18(4): 302-314, 2013
- 10) Li J, Qu X, Yao J, Caruana G, Ricardo SD, Yamamoto Y, Yamamoto H, Bertram JF. Blockade of endothelial-mesenchymal-transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 59(10): 2612-2624, 2010
- 11) Takeuchi A, Yamamoto Y, Munesue S, Harashima A, Shimizu K, Yonekura H, Yamamoto H, Tsuchiya H. Low molecular weight heparin inhibits RAGE-dependent human fibrosarcoma cell growth and metastasis. *Cancer Sci* 104(6): 740-749, 2013
- 12) Selvin E, Halushka MK, Rawlings AM, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J, Astor BC. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* 62(6): 2116-21, 2013